

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 4 月 26 日 (26.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/29187 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 1/21. (72) 発明者; および  
9/10, 15/54 // (C12N 1/21, C12R 1:465) (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田口精一  
(TAGUCHI, Seiichi) [JP/JP]; 〒350-1123 埼玉県川越市  
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/07135 脇田本町31-16 グリーンプラザ201号 Saitama (JP). 百  
(22) 国際出願日: 2000 年 10 月 13 日 (13.10.2000) 瀬春生 (MOMOSE, Haruo) [JP/JP]; 〒247-0071 神奈  
(25) 国際出願の言語: 日本語 (74) 代理人: 中村 稔, 外 (NAKAMURA, Minoru et al.);  
(26) 国際公開の言語: 日本語 〒100-8355 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東  
(30) 優先権データ: (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
特願平 11/295649 1999 年 10 月 18 日 (18.10.1999) JP BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株 DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,  
式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒104-0031 IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,  
東京都中央区京橋1丁目15番1号 Tokyo (JP). LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,  
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING MICROORGANISM-ORIGIN TRANSGLUTAMINASE

(54) 発明の名称: 微生物由来トランスグルタミナーゼの製造法

(57) Abstract: A process for the secretory production of transglutaminase by using a microorganism. A process for the mass production of transglutaminase characterized by comprising culturing a bacterium belonging to the genus *Streptomyces* which has an expression plasmid carrying a transglutaminase gene originating in actinomycetes and the inherent (intact) promoter thereof, thus making the bacterium to secrete protransglutaminase in the early stage to the medium stage of the culture, and then cutting off and removing the pro-structure with *Streptomyces*-origin protease, etc. in the latter stage of the culture to thereby give matured (active) transglutaminase.

(57) 要約:

本発明は、微生物によるトランスグルタミナーゼの分泌生産方法に関する。

本発明は、放線菌由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子およびその本来の(天然の)プロモーターを含む発現プラスミドを有するストレプトマイセス属細菌を培養することにより、培養初期から中期にはプロトランスグルタミナーゼを分泌させ、培養後期にはストレプトマイセス属細菌に由来するプロテアーゼ等でプロ構造体を切断除去することにより成熟型(活性型)のトランスグルタミナーゼを取得することとを特徴とする、トランスグルタミナーゼの多量製造方法である。



(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## 微生物由来トランスグルタミナーゼの製造法

## 発明の背景

本発明はストレプトマイセス・リビダンス(*Streptomyces lividans*) (以下、*S. lividans*と略すことがある)の宿主-ベクター系を用いて、遺伝子組換え法により放線菌由来のトランスグルタミナーゼを分泌生産させる方法に関するものである。本発明によって分泌生産されるトランスグルタミナーゼは食品加工や医薬等に幅広く利用されている。

本発明によって分泌生産されるトランスグルタミナーゼはタンパク質のペプチド鎖内にある $\gamma$ -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である。本酵素をタンパク質に作用させると、 $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)-Lys 架橋形成反応、Glnの脱アミド化によるGluへの置換反応が起こりうる。このトランスグルタミナーゼは、ゼリー等のゲル化食品、ヨーグルト、チーズ、あるいはゲル状化粧品などの製造や食肉の肉質改善等に利用されている(特公平1-50382)。また、熱に安定なマイクロカプセルの素材、固定化酵素の担体などの製造に利用されているなど、産業上利用性の高い酵素である。

トランスグルタミナーゼはこれまでに動物由来のものと微生物由来のもの(マイクロビアルトランスグルタミナーゼ:以下「MTG」という)が知られている。前者は、カルシウムイオン依存性の酵素で、動物の臓器、皮膚、血液などに分布している。例えば、モルモット肝臓トランスグルタミナーゼ(K. Ikura et al. *Biochemistry* 27 2898(1988))、ヒト表皮ケラチン細胞トランスグルタミナーゼ(M. A. Phillips et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 9333(1990))、ヒト血液凝固因子XIII(A. Ichinose et al. *Biochemistry* 25 6900(1990))などがある。

後者については、ストレプトバーチシリウム属の菌から、カルシウム非依存性のものが発見されている。例えば、ストレプトバーチシリウム・グリセオカルネウム (*Streptoverticillium griseocarneum*) IFO 12776、ストレプトバーチシリウム・シナモニウム (*Streptoverticillium cinnamoneum* sub sp. *cinnamoneum*) (以下、*S. cinnamoneum*と略すことがある) IFO 12852、ストレプトバーチシリウム・モバラエンス (*Streptoverticillium mobaraense*) (以下、*S. mobaraense*と略すことがある) IFO 13819 等があげられている (特開昭64-27471)。これらの微生物が生産するトランスグルタミナーゼの一次構造はペプチドマッピング及び遺伝子構造解析の結果、動物由来のものとは相同性を全く持たないことが判明している (ヨーロッパ特許公開公報0 481 504 A1)。

微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) は、上記菌類等の培養物から精製操作をへて製造されているため、供給量、効率等の点で問題があった。また、遺伝子工学的手法によるトランスグルタミナーゼの製造も試みられている。トランスグルタミナーゼタンパク質およびその遺伝子については例えば、特開昭64-27471、*Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 82-87(1994)、*Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 88-92(1994)、特開平5-199883、*Biochimie*, 80, 313-319(1998)、*Eur. J. Biochem.*, 257, 570-576(1998)、WO 9606931、WO 9622366などに報告されており、これらには例えば*S. lividans*、アスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*)、大腸菌 (*Escherichia coli*) (以下、*E. coli*と略すことがある) 等の宿主ベクター系での発現生産に関する報告がなされている。また、*E. coli*、酵母等の微生物における分泌発現 (特開平5-199883) による方法と*E. coli*でMTGを不活性融合タンパク質封入体として発現させた後、この封入体をタンパク質変性剤で可溶化し、脱変性剤処理を経て再生させることにより活性をもつMTGを生産する方法 (特開平6-30771) が報告されている。しかしながら、従来の方法による微生物による分泌発現においては、その発現量が非常に少ないという問題点が指

摘される。ストレプトマイセスにおけるトランスグルタミナーゼの分泌生産に関しては、具体的な分泌蓄積量の記載がある例として、ストレプトマイセス・リビダンスを宿主とする遺伝子組換え法でストレプトバーチシリウム・モバラエンス由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子を導入した報告があるが、その分泌量は0.1mg/l程度でしかない(Biosci.Biotech.Biochem., 58, 82-87(1994); 特開平5-199883)。

#### 発明の開示

本発明は、ストレプトマイセス属細菌にトランスグルタミナーゼを多量に分泌生産させることによって、トランスグルタミナーゼを多量に製造する方法を提供することを目的とする。

本発明の方法は、放線菌ストレプトマイセスの宿主-ベクター系を用いて、放線菌由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子、すなわちシグナルペプチド領域とプロ構造領域および成熟体構造領域、並びに当該トランスグルタミナーゼ遺伝子の発現を制御するその本来の（天然の）プロモーター領域を用いて、ストレプトマイセス属細菌内で高発現可能な発現型プラスミドを構築し、この発現型プラスミドをストレプトマイセス属細菌に導入し、培養することにより、培養初期から中期にはプロ構造部の付加したトランスグルタミナーゼ（プロトランスグルタミナーゼ）を分泌させ、培養後期にはプロ構造体をストレプトマイセス属細菌に由来するプロテアーゼ等で切断除去することにより成熟型（活性型）のトランスグルタミナーゼを取得することを特徴とする、トランスグルタミナーゼの多量製造方法である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、発現用プラスミドpUJ-MTGの構築手順を示す。

### 発明を実施するための最良の形態

本発明の方法により、ストレプトマイセス属細菌が宿主－ベクター系として用いられ、トランスグルタミナーゼ遺伝子の本来のプロモーターの下流にプロ構造部を含むトランスグルタミナーゼ（プロトランスグルタミナーゼ）遺伝子を結合した発現構築物が作製され、これがストレプトマイセス属細菌中に導入され、発現され、菌体外に分泌されたプロトランスグルタミナーゼが更にそのストレプトマイセス属自身が生産するプロテアーゼ等によって切断除去されることにより、成熟型（活性型）のトランスグルタミナーゼが多量に得られる。

分泌型タンパク質は一般にはプレペプチドまたはプレプロペプチドとして翻訳され、その後、翻訳後修飾を受けて成熟型タンパク質になることが知られている。すなわち、一般に、プレペプチドまたはプレプロペプチドとして翻訳された後、シグナルペプチド（「ブレ部分」）が切断されて成熟ペプチドまたはプロペプチドに変換され、プロペプチドはプロテアーゼによってさらにプロ部分が切断されて成熟型ペプチドになることが知られている。トランスグルタミナーゼはそのようなタンパク質の一つである。本明細書において、シグナルペプチドおよびプロ部分の両方を有するトランスグルタミナーゼ、すなわち、一次翻訳産物を「プレプロトランスグルタミナーゼ」と称することがあり、またシグナルペプチドを有しないがプロ部分を有するトランスグルタミナーゼを「プロトランスグルタミナーゼ」と称することがある。プロトランスグルタミナーゼのプロ部分は「プロ構造部」または単に「プロ構造」と称することもあり、本明細書においてトランスグルタミナーゼの「プロ構造部／プロ構造」とタンパク質の「プロ部分」とは互換的に使用される。従って、「プロトランスグルタミナーゼ」は「プロ構造部を付加したトランスグルタミナーゼ」とも称される。

本明細書においてプロ部分を「切断除去」したタンパク質とは、ペプチド結合

を切断することによってプロ部分を構成する少なくとも1以上のアミノ酸を除去したタンパク質をいい、そのN末端領域が天然の成熟型タンパク質のものと完全に一致するタンパク質、および、そのタンパク質の活性を有する限り、天然のタンパク質に比較してN末端にプロ部分に由来する1以上の余分のアミノ酸を有するものおよび天然の成熟型タンパク質よりもアミノ酸配列が短いタンパク質も含まれる。また、本明細書において「成熟型トランスグルタミナーゼ」と「活性型トランスグルタミナーゼ」は同じ意味で使用される。

本発明に使用される遺伝子構築物は、一般にプロモーター、プレプロトランスグルタミナーゼをコードする核酸断片、およびストレプトマイセス属細菌中で目的タンパク質遺伝子を発現させるために必要な制御配列を含む適切な配列を適切な位置に有するものである。この構築物のために使用できるベクターは特に制限されず、ストレプトマイセス属細菌中で機能し得るものであればよく、プラスミドのように染色体外で自律増殖するものであっても細菌染色体に組み込まれるものであってもよい。ストレプトマイセス属細菌由来のプラスミドが好ましく、そのようなプラスミドとしては、例えばpIJ702(J.Gen.Microbiol.,129,2703-2714,(1983))、及びこれらを改良したプラスミド等が挙げられる。

本発明の方法において、ストレプトマイセス属細菌でトランスグルタミナーゼ遺伝子を発現させるために利用できるプロモーターは放線菌のトランスグルタミナーゼ遺伝子の本来のプロモーターである。

ただし、放線菌においては、E.coliにおけるようにプロモーターのコンセンサス配列は明確になっておらず、プロモーター領域が必ずしも特定できない場合がある。このような場合、トランスグルタミナーゼの構造遺伝子及びその発現を制御するプロモーター領域を含むのに十分な長さの5'上流域を包含する遺伝子断片を利用すればよい。

本発明において利用できるトランスグルタミナーゼ遺伝子は特に限定されない

が、ストレプトバークシリウム・シナモニウム IF0 12852、ストレプトバークシリウム・グリセオカルニウム IF0 12776、*S.mobaraence* IF0 13819、ストレプトマイセス・リディカス(*Streptomyces lydicus*)(W096-06931)等の放線菌由来の分泌型トランスグルタミナーゼ遺伝子が好ましい。*S.cinnamoneum*または*S.mobaraense*由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子が特に好ましく、それらのトランスグルタミナーゼ遺伝子の本来の(天然の)プロモーターと共に使用される。

配列表配列番号 1 に本発明者らが決定した*S.cinnamoneum* IF012852由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子の5' 上流域を一部含む全塩基配列を、および、配列番号 2 に該塩基配列にコードされるアミノ酸配列を示す。アミノ酸配列の 1 番目から 3 2 番目までがブレ部分の配列、3 3 番目から 8 6 番目までがプロ部分の配列、8 7 番目から 4 1 6 番目までが成熟型トランスグルタミナーゼの配列であると推定される。

また、配列表配列番号 3 に*S.mobaraense* IF013819由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子の5' 上流域の一部を含む全塩基配列を、および、配列番号 4 に該配列にコードされるアミノ酸配列を示す。アミノ酸配列の 1 番目から 3 1 番目までがブレ部分の配列、3 2 番目から 7 6 番目までがプロ部分の配列、7 7 番目から 4 0 7 番目までが成熟型トランスグルタミナーゼの配列である。

本発明に使用される遺伝子構築物のストレプトマイセス属細菌への導入方法は特に限定されず、通常よく用いられるプロトプラスト法(Gene, 39, 281-286(1985); 特開平3-251182)、エレクトロポレーション法(Bio/Technology, 7, 1067-1070(1989))等の方法を用いれば良い。また得られた形質転換体は通常よく用いられている方法や条件に従って培養すればよい。例えば、上記微生物を培養するための培地としては通常の炭素源、窒素源、無機イオンを含有する通常の培地でよい。さらに高い増殖性を得るためにはビタミン、アミノ酸等の有機微量栄養素やポリペプトン、酵母エキス等の天然素材を添加する事が望ましい。炭素源として



は、可溶性デンプン、グルコースやシュクロース等の炭水化物、有機酸、アルコール類、その他が適宜使用される。培養は好気条件下にpH5.0から8.5、温度を15℃から37℃の適当な範囲に制御しつつ、1日ないし2週間程度培養を行う。

窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩、その他が用いられる。無機イオンとしては、マグネシウムイオン、磷酸イオン、カリウムイオン、鉄イオン、その他が必要に応じ適宜使用される。そのような条件下で形質転換体を培養することにより、プレプロトランスグルタミナーゼが菌体内で多量に生産され、プロトランスグルタミナーゼとして菌体外に分泌され、その後、ストレプトマイセス属細菌自身がこの培養条件下で分泌生産するプロテアーゼによって培地中で切断され、成熟型（活性型）トランスグルタミナーゼが多量に培養液中に蓄積する。

本発明により分泌生産されたトランスグルタミナーゼはそれぞれの特性に応じ、当業者によく知られた方法に従って、培養後の培地から分離精製することができる。例えば、菌体の遠心除去等を行った後、硫酸アンモニウムやエタノール沈殿をはじめ、イオン交換カラムクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、等電点電気泳動、ゲル濾過等の適切な既知の方法により、またはこれらを組み合わせることにより分離、精製すれば良い。

## 実施例

### 実施例1. *S.cinnamoneum* IF0 12852のトランスグルタミナーゼ遺伝子の取得

*S.cinnamoneum* CBS683.68のトランスグルタミナーゼ遺伝子の配列は既に決定されている(Biochimie., 80, 313-319(1998))。この配列を参考にして、配列番号5と配列番号6に示したプライマーを合成し、斉藤、三浦の方法(Biochem. Biophys. Act., 72, 619(1963))により調製した*S.cinnamoneum* IF0 12852の染色体D

NAから成熟トランスグルタミナーゼ配列をコードする領域をPCR法にて増幅した。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝酒造社製)を用い、反応条件はこれのプロトコールに従った。

(配列番号5) 5'-TCCGATGACCGGGAACTCCTCCCGCCGAG-3'

(配列番号6) 5'-CGGCCAGCCTTGCTCCACCTTGGCGGGGGC-3'

[配列表フリーテキスト]

配列番号5 : *S.cinnamoneum*由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子増幅用PCRプライマー

配列番号6 : *S.cinnamoneum*由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子増幅用PCRプライマー

次に増幅した約960bpのDNA断片を、Random Primer DNA Labeling Kit Ver. 2(宝酒造社製)と $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ を用いて、添付のプロトコールに従って反応させ、DNAプローブを作製した。作製したプローブと*S.cinnamoneum* IF0 12852の染色体DNAを用いて、Molecular Cloning 第2版(J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p9.31(1989))に記載されているような一般的方法に従って、サザンブロットハイブリダイゼーションを行ったところ、制限酵素BamHIで切り出される約3.5 kbの断片にトランスグルタミナーゼ遺伝子が存在していることが確認できた。そこで*S.cinnamoneum* IF0 12852の染色体DNAをBamHIで消化した約3.5 kbの断片をEASYTRAP Ver.2 (宝酒造社製)を用いてアガロースゲル電気泳動により回収し、これをpUC18のBamHI部位に挿入した後、*Escherichia coli* JM109 (宝酒造社製)のコンピテントセルに導入し、ライブラリーを作製した。先に作製したトランスグルタミナーゼのDNAプローブを用いて、Molecular Cloning 第2版 (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p1.90(1989)) に記載されるような一般的手順に従ったコロニーハイブリダイゼーションにより、ライブ

ラーのスクリーニングを行い、トランスグルタミナーゼ遺伝子断片がクローン化されたプラスミドを保持する菌株を取得し、これよりプラスミドを回収し、pB3.5と名付けた。

pB3.5にクローン化されている断片の塩基配列を決定したところ、*S.cinnamoneum* IF0 12852のトランスグルタミナーゼ遺伝子は、*S.cinnamoneum* CBS683.68のトランスグルタミナーゼ遺伝子とほぼ同じ塩基配列を有することが確認された。またトランスグルタミナーゼ遺伝子はpUC18のマルチクローニングサイトのEcoRIからHindIIIの方向に転写されるように挿入されている。塩基配列の決定はダイターミネーターサイクルシーケンシングキット（PEアプライドバイオシステムズ社製）とDNAシーケンサー373A（PEアプライドバイオシステムズ社製）を用いて行った。

決定された塩基配列と該塩基配列にコードされるアミノ酸配列をそれぞれ配列表配列番号1および2に示す。アミノ酸配列の1番目から32番目までがブレ部分の配列、33番目から86番目までがプロ部分の配列、87番目から416番目までが成熟型トランスグルタミナーゼの配列であると推定される。

## 実施例2. トランスグルタミナーゼ遺伝子発現用プラスミドの構築

### 1) プラスミドベクター(pIJ702)の取得

pIJ702の調製は[J.Bacteriol., 162, 406-412(1985); J.Bacteriol., 169, 1929-1937(1987)]に従い行った。具体的にはストレプトマイセス・リビダンス66をpIJ702で形質転換したストレプトマイセス・リビダンス3131(ATCC 35287)(J.Gen.Microbiol., 129, 2703-2714(1983))を以下の培地条件で30℃、2日間培養した。

[YEME培地+0.5%グリシン+50μg/mlチオストレプトン]

0.3%            イースト・エキストラクト

0.5%            ペプトン

0.3%	マルト・エキストラクト
0.1%	塩化マグネシウム
1.0%	グルコース
34.0%	サッカロース
0.5%	グリシン
0.1%	50mg/mlチオストレプトン溶液

(シグマ：ジメチルスルホキシド溶液) (pH7.0)

上記条件下で培養した培養培地200mlを遠心分離(12,000g, 4°C, 10分間)し、50mM Tris-HCl(pH8.0)-5mM EDTA-50mM NaClで洗浄後、得られた菌体を50mM Tris-HCl(pH8.0)-10mM EDTA-25% Sucrose (以下「TE-Sucrose」という。)10mlに懸濁した。次に30mg/mlのリゾチーム (シグマ) を含むTE-Sucrose 2mlおよび0.25M EDTA 4mlを加え、37°Cで30分間インキュベート後、20% SDS 2mlを加え、さらに5M NaCl 5mlを加えて穏やかに攪拌した後、0°Cで1晩インキュベートした。次に遠心分離(100,000g, 4°C, 40分間)により得られた上清に30%ポリエチレン6000を終濃度10%になるように加え、0°Cで4.5時間インキュベートした。その後、遠心分離(900 g, 4°C, 5分間)し、沈殿を10mM Tris-HCl(pH8.0)-1mM EDTA-50mM NaClに溶かした。次に、塩化セシウム16.8gおよび10mg/mlの濃度にエチジウムブロマイドを10mM Tris-HCl(pH8.0)-1mM EDTA (以下「TE」という。)に溶かし調製した溶液1.2mlを加え、遠心分離(1,300 g, 室温, 15分間)により、残さを取り除いた後、遠心分離 (230,000 g, 20°C, 12時間) を行った。遠心後、紫外線照射下でプラスミドDNA層を分離抽出し、TEで飽和したブタノールによる抽出操作を3回繰り返してエチジウムブロマイドを除いた。さらにTEで4°Cで1晩透析した後、TE飽和フェノールで1回、クロロホルム・イソアミルアルコールで2回の抽出操作を行い、水層を回収した。次に1/10容量の3M酢酸ナトリウム(pH5.2)溶液と2倍容

量のエタノールを加え、-80°Cに30分間静置し、遠心分離（12,000 g, 4°C, 15分間）により沈殿を回収し、70%エタノールで洗浄後、乾燥し、TE200 $\mu$ lに溶かした。約10 $\mu$ gのプラスミドDNAが得られた。

## 2) 発現用プラスミド構築

まず、放線菌(*Streptomyces*)と*E. coli*の両方の宿主で複製可能なシャトルベクターを作製した。放線菌多コピープラスミドのpIJ702（約5.8kb）をSacIとPstIで切断し、mel（チロシナーゼ遺伝子）プロモーター領域を除去した5.1kbの大きい断片を調製した。次にプロテアーゼインヒビターSSI(*Streptomyces subtilisin inhibitor*)と抗菌ペプチド（アビデシン）遺伝子の融合体が組み込まれたpOS $\Delta$ B-Ap1（約7.9kb）（Appl. Environ. Microbiol., 60, 3566-3572(1994)）をHindIIIとPstIで切断し、約2kbの断片を調製した。さらに*Escherichia coli*の多コピー型プラスミドpUC18（宝酒造社製）をEcoRIで切断し、T4 DNA ポリメラーゼ（宝酒造社製）で平滑末端化してセルフライゲーションを行い、EcoRIで切断されないプラスミドを選択し、さらにSacIとHindIII切断した2.7kbの断片を調製した。

次にpIJ702のSacI-PstI 5.1kb断片とpOS $\Delta$ B-Ap1のHindIII-PstI 2kb断片、およびpUC18のSacI-HindIII 2.7kb断片の3者ライゲーションを行い、シャトルベクター-pUJS（約9.8kb）を構築した。

さらにpUJSをHindIIIとEcoRI切断して大断片8.6kbを回収した。（1）でクローン化した*S. cinamomeum* IFO 12852のトランスグルタミナーゼ遺伝子を搭載したpB3.5（約6.2kb）をHindIIIとEcoRIで切断し、3.5kbのHindIII-EcoRI断片を回収した。この3.5kbのHindIII-EcoRI断片をpUJSのHindIIIとEcoRIサイトに挿入したpUJ-MTG（約12.1kb）を構築した。

以上の構築手順を図1に示す。

pUJ-MTGを形質転換して得られた形質転換体*E. coli* AJ13669は通商産業省工業

技術院生命工学工業技術研究所（日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東 1 丁目 1-3）に寄託されている（平成11年10月14日付けで受託番号FERM P-17602として寄託され、平成12年 8 月28日付けで受託番号FERM BP-7287としてブダペスト条約に基づく寄託へ移管された）。

### 実施例 3. *S.lividans* TK24への形質導入

*S.lividans* TK24は*S.lividans* 66に由来する株であり、ストレプトマイシン耐性が付与されている(GENETIC MANIPULATION OF STREPTOMYCES, A LABORATORY MANUAL: D.A.Hopwood et al., p266, 1985, The John Innes Foundation Norwich)。本菌株はD.A.Hopwood(John Innes Institute, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, U.K.)より提供されたものであり、D.A. Hopwood研究室より入手可能である。

*S.lividans* TK24を[特開平3-251182、Hunter, I.S. "DNA Cloning" A Practical Approach 2, Glover, D.M.(Ed.) IRL Press(1985)、GENETIC MANIPULATION OF STREPTOMYCES, A LABORATORY MANUAL: D.A.Hopwood et al., p104, 1985, The John Innes Foundation Norwich]の方法に従って、プロトプラスト化し形質導入した。具体的には*S.lividans* TK24をYEME培地+0.5%グリシンで30℃、2日間培養した。培養液200mlを遠心分離(1,300 g, 室温、10分間)し、得られた菌体を0.35 Mサッカロース72mlに懸濁した。

次に、この懸濁液を遠心分離(1,300 g, 室温、10分間)し、菌体を1mg/mlのリゾチーム（シグマ）を含むP緩衝液60mlに再懸濁し、これを30℃、2.5時間インキュベートし、脱脂綿で濾過し、残さを取り除いた。得られた濾液を遠心分離 (1,300 g, 室温、10分間) し、P緩衝液25mlで洗浄を 2 回繰り返した後、沈殿を P 緩衝液 1mlに懸濁し、プロトプラスト懸濁液とした。

## [P緩衝液]

TES[N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulphonic acid]	5.73g
サッカロース	103g
塩化マグネシウム	2.03g
硫酸カリウム	0.5g
塩化カルシウム	3.68g
微量元素溶液	2ml/L(pH7.4)

なお、1%リン酸 1 カリウム溶液を別調製し、使用直前に100ml P緩衝液当たり1mlを加えた。

## [微量元素溶液]

1L中、以下のものを含む。

塩化亜鉛	40mg
塩化第二鉄	200mg
塩化第二銅	10mg
塩化マンガン	10mg
四硼酸ナトリウム	10mg
モリブデン酸アンモニウム	10mg

次に、トランスグルタミナーゼ遺伝子発現プラスミドpUJ-MTG (約12.1kb) のS. lividans TK24のプロトプラスト懸濁液への形質導入を以下のように行った。

DNA溶液(0.2 $\mu$ g/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l
S. lividans TK24のプロトプラスト懸濁液	100 $\mu$ l
0.35M サッカロース	20 $\mu$ l

20%ポリエチレングリコール1000を含むP緩衝液

1.5ml

を穏やかに混和し、室温で2分間静置する。

遠心分離(1,700 g、室温、10分間)し、ペレットを集め、P緩衝液で2回洗浄を繰り返す、P緩衝液1mlに懸濁した後に200 $\mu$ lずつを以下のR-2寒天培地に塗布した。

[R-2寒天培地]

1) R-2/A

硫酸カリウム	0.5g/l
塩化マグネシウム	20.2g/l
塩化カルシウム	5.9g/l
グルコース	20.0g/l
プロリン	6.0g/l
カザミノ酸	0.2g/l
微量元素溶液	4 ml
寒天	44.0g/l

2) R-2/B

TES	11.5g/l
イースト・エキストラクト	10.0g/l
サッカロース	203 g/l (pH7.4)

3) 1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

1)2)3)をそれぞれ別調製し、プレート培地作製時にR-2/AおよびR-2/Bを混合し、さらに1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 溶液を最終容量200ml当たり1mlの割合で混合した。



形質転換体が塗布されたR-2寒天培地を30°Cで18時間インキュベートした後、200 $\mu$ g/mlのチオストレプトンを含むP緩衝液1mlを加え、寒天の全表面を覆い、さらに30°Cで7日間インキュベートし、コロニーを得た。得られたコロニーからプラスミドを調製して目的のプラスミドが導入されていることを確認した。

#### 実施例4. トランスグルタミナーゼ遺伝子の発現と分泌生産

形質転換体pUJ-MTG/*S. lividans* TK24をチオストレプトン10 $\mu$ g/mlを含むトリプトン・ソーヤ・ブロス(DIFCO社製)液体培地4mlで30°C、3日間培養し、この1mlを100mlの上記液体培地(500ml容坂口フラスコ)にシードし、30°Cで2週間培養した。経時的に培養液をサンプリングして、その培養上清液10 $\mu$ lをSDS-PAGEに供してから、特開平6-046855記載の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、Molecular Cloning 第2版(J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p18.60(1989))に記載されるような一般的条件でウエスタンブロットを行った。その結果、培養7~10日目頃まではプロ構造部の付加したトランスグルタミナーゼ(プロトランスグルタミナーゼ)の分泌生産(約40-50mg/l)が認められ、さらに培養を継続するとプロトランスグルタミナーゼがプロセッシングを受けた成熟トランスグルタミナーゼとほぼ同じ分子量を有するトランスグルタミナーゼの生成量が増大し、2週間目頃には約40-50mg/lの成熟型トランスグルタミナーゼが蓄積した。

プロ構造部の付加したトランスグルタミナーゼ(プロトランスグルタミナーゼ)の分泌生産量の多い時期の培養上清を用いて、SDS-PAGE後、PVDF膜にセミドライブロットニングした(「遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析」、東京化学同人(1993))。ブロットニング後、PVDF膜をクマシーブリリアントブルーで染色し、脱染、風乾した。プロトランスグルタミナーゼの部分を切り取り、プロテインシークエンサー(モデル476A、パーキンエルマー社製)でN末端アミ

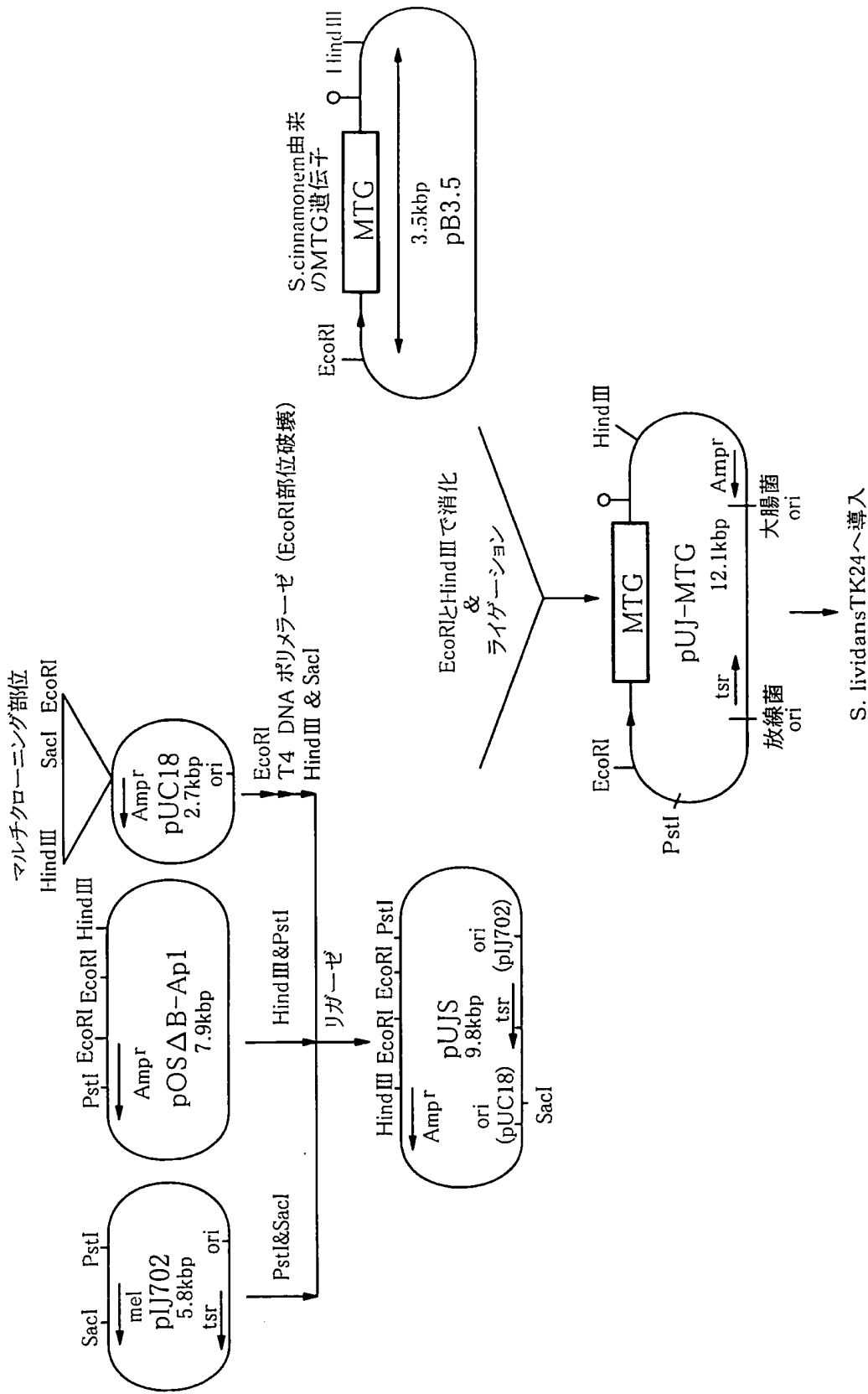
ノ酸配列の解析を行った。その結果、プロトランスグルタミナーゼのN末端アミノ酸配列の10アミノ酸配列 (Gly-Asp-Gly-Glu-Glu-Lys-Gly-Ser-Tyr-Ala-) (配列番号7) が確認された。このアミノ酸配列はBiochimie., 80, 313-319(1998)で示されたプロ領域の配列とは異なっており、実施例1で決定したアミノ酸配列 (配列番号2) と一致した。

本発明により、ストレプトマイセス属細菌にトランスグルタミナーゼを生産させ、培養液中にトランスグルタミナーゼを多量に得ることができる。本発明の方法によって培養液中に蓄積するトランスグルタミナーゼは、ストレプトマイセス属細菌自身によって生産されるプロテアーゼによって切断された成熟型トランスグルタミナーゼであるため、簡便かつ大規模に培地から成熟型トランスグルタミナーゼを回収することができる。

## 請求の範囲

1. 放線菌由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子配列及び当該トランスグルタミナーゼ遺伝子の発現を制御しているプロモーター配列を含む遺伝子構築物を導入したストレプトマイセス属細菌。
2. 放線菌がストレプトバーチシリウム・シナモニウムである請求項1に記載のストレプトマイセス属細菌。
3. ストレプトマイセス・リビダンスである請求項1または2に記載のストレプトマイセス属細菌。
4. 請求項1～3のいずれか1項に記載のストレプトマイセス属細菌を培養し、放線菌由来のプロトランスグルタミナーゼを培地中に分泌させることを特徴とする、プロトランスグルタミナーゼの製造法。
5. 請求項1～3のいずれか1項に記載のストレプトマイセス属細菌を培養し、放線菌由来のプロトランスグルタミナーゼを培地中に分泌させ、前記ストレプトマイセス属細菌由来のプロテアーゼによって前記プロトランスグルタミナーゼのプロ構造部を切断除去し、放線菌由来の成熟型トランスグルタミナーゼを回収することを特徴とする、成熟型トランスグルタミナーゼの製造法。
6. プロトランスグルタミナーゼが配列番号2の33番目のグリシン残基から416番目のプロリン残基に至るアミノ酸配列を有する、請求項4に記載の方法。
7. 成熟型トランスグルタミナーゼが配列番号2の87番目のセリン残基から416番目のプロリン残基に至るアミノ酸配列を有する、請求項5に記載の方法。

FIG.1



## SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> A method of producing microbial transglutaminase

<130> Y1H0984

<140>

<141>

<150> JP 11-295649

<151> 1999-10-18

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1461

<212> DNA

<213> Streptoverticillium cinnamoneum

<220>

<221> CDS

<222> (151)..(1398)

<400> 1

cggcggcagc ctccttgcc gccggcgag cgacgcagga cggcgcgcc aaggccctga 60

gcggcagctc gtcgcaaacc cctccatcgc gtcgtgctct cacatgccct cgtttcacga 120

ggcttcacca caaggagatt attgatttcc atg cac aaa cgt cgg aga ctt ctc 174

Met His Lys Arg Arg Arg Leu Leu

1

5

gcc ttc gcc act gtg ggt gcg gtc ata tgc acc gca gga ttc aca cct 222

Ala Phe Ala Thr Val Gly Ala Val Ile Cys Thr Ala Gly Phe Thr Pro

10

15

20

tcg gtc agc cag gcc gcc agc agt ggc gat ggg gaa gag aag ggg tcc 270

Ser Val Ser Gln Ala Ala Ser Ser Gly Asp Gly Glu Glu Lys Gly Ser

25

30

35

40

tac gcc gaa acg cac ggc ctg acg gcg gat gac gtc gag agc atc aac 318

Tyr Ala Glu Thr His Gly Leu Thr Ala Asp Asp Val Glu Ser Ile Asn

45

50

55

gca ctg aac gaa aga gct ctg act ctg ggc caa cct ggc aag cct ccg 366

Ala Leu Asn Glu Arg Ala Leu Thr Leu Gly Gln Pro Gly Lys Pro Pro

60

65

70

aag gaa tta cct ccg agc gcc agc gcg ccc tcc cgg gcc ccc tcc gat 414

Lys Glu Leu Pro Pro Ser Ala Ser Ala Pro Ser Arg Ala Pro Ser Asp

75

80

85

gac cgg gaa act cct ccc gcc gag ccg ctc gac agg atg cct gag gcg 462

Asp Arg Glu Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Glu Ala

90	95	100		
tac cgg gcc tac gga ggc agg gcc act acg gtc gtc aac aac tac ata			510	
Tyr Arg Ala Tyr Gly Gly Arg Ala Thr Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile				
105	110	115	120	
cgc aag tgg cag cag gtc tac agt cac cgc gac gga aag aaa cag caa			558	
Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Lys Lys Gln Gln				
	125	130	135	
atg acc gaa gag cag cga gaa aag ctg tcc tac ggt tgc gtt ggc gtc			606	
Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Lys Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val				
	140	145	150	
acc tgg gtc aac tcg ggc ccc tac ccg acg aac aga ttg gcg ttc gcg			654	
Thr Trp Val Asn Ser Gly Pro Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala				
	155	160	165	
tcc ttc gac gag aac aag tac aag aac gac ctg aag aac acc agc ccc			702	
Ser Phe Asp Glu Asn Lys Tyr Lys Asn Asp Leu Lys Asn Thr Ser Pro				
	170	175	180	
cga ccc gat gaa acg cgg gcg gag ttc gag ggt cgc atc gcc aag ggc			750	
Arg Pro Asp Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Ile Ala Lys Gly				
	185	190	195	200
agt ttc gac gag ggg aag ggt ttc aag cgg gcg cgt gat gtg gcg tcc			798	
Ser Phe Asp Glu Gly Lys Gly Phe Lys Arg Ala Arg Asp Val Ala Ser				
	205	210	215	

gtc atg aac aag gcc ctg gaa aat gcc cac gac gag ggg act tac atc 846  
Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Gly Thr Tyr Ile

220

225

230

aac aac ctc aag acg gag ctc acg aac aac aat gac gct ctg ctc cgc 894  
Asn Asn Leu Lys Thr Glu Leu Thr Asn Asn Asn Asp Ala Leu Leu Arg

235

240

245

gag gac agc cgc tcg aac ttc tac tcg gcg ctg agg aac aca ccg tcc 942  
Glu Asp Ser Arg Ser Asn Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser

250

255

260

ttc aag gaa agg gac ggc ggc aac tac gac ccg tcc aag atg aag gcg 990  
Phe Lys Glu Arg Asp Gly Gly Asn Tyr Asp Pro Ser Lys Met Lys Ala

265

270

275

280

gtg atc tac tcg aag cac ttc tgg agc ggg cag gac cag cgg ggc tcc 1038  
Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Gln Arg Gly Ser

285

290

295

tcc gac aag agg aag tac ggc gac ccg gaa gcc ttc cgc ccc gac cag 1086  
Ser Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Glu Ala Phe Arg Pro Asp Gln

300

305

310

ggc acc ggc ctg gtc gac atg tcg aag gac aga agc att ccg cgc agt 1134  
Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Lys Asp Arg Ser Ile Pro Arg Ser

315

320

325



ccg gcc aag ccc ggc gaa ggt tgg gtc aat ttc gac tac ggt tgg ttc 1182  
Pro Ala Lys Pro Gly Glu Gly Trp Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe

330

335

340

ggg gct caa aca gaa gcg gat gcc gac aaa acc aca tgg acc cac ggc 1230  
Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Thr Trp Thr His Gly

345

350

355

360

gac cac tac cac gcg ccc aat agc gac ctg ggc ccc atg cac gta cac 1278  
Asp His Tyr His Ala Pro Asn Ser Asp Leu Gly Pro Met His Val His

365

370

375

gag agc aag ttc cgg aag tgg tct gcc ggg tac gcg gac ttc gac cgc 1326  
Glu Ser Lys Phe Arg Lys Trp Ser Ala Gly Tyr Ala Asp Phe Asp Arg

380

385

390

gga gcc tac gtg atc acg ttc ata ccc aag agc tgg aac acc gcc ccc 1374  
Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro

395

400

405

gcc aag gtg gag caa ggc tgg ccg tgacaggctg gtactacgac ctctgctgat 1428  
Ala Lys Val Glu Gln Gly Trp Pro

410

415

ttctgcccggtcagtcacg cctctcgacg cga 1461

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 416

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Streptoverticillium cinnamoneum

&lt;400&gt; 2

Met His Lys Arg Arg Arg Leu Leu Ala Phe Ala Thr Val Gly Ala Val

1 5 10 15

Ile Cys Thr Ala Gly Phe Thr Pro Ser Val Ser Gln Ala Ala Ser Ser

20 25 30

Gly Asp Gly Glu Glu Lys Gly Ser Tyr Ala Glu Thr His Gly Leu Thr

35 40 45

Ala Asp Asp Val Glu Ser Ile Asn Ala Leu Asn Glu Arg Ala Leu Thr

50 55 60

Leu Gly Gln Pro Gly Lys Pro Pro Lys Glu Leu Pro Pro Ser Ala Ser

65 70 75 80

Ala Pro Ser Arg Ala Pro Ser Asp Asp Arg Glu Thr Pro Pro Ala Glu

85 90 95

Pro Leu Asp Arg Met Pro Glu Ala Tyr Arg Ala Tyr Gly Gly Arg Ala

100 105 110

Thr Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser

115 120 125

His Arg Asp Gly Lys Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Lys

130	135	140	
Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Pro Tyr			
145	150	155	160
Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asn Lys Tyr Lys			
	165	170	175
Asn Asp Leu Lys Asn Thr Ser Pro Arg Pro Asp Glu Thr Arg Ala Glu			
	180	185	190
Phe Glu Gly Arg Ile Ala Lys Gly Ser Phe Asp Glu Gly Lys Gly Phe			
	195	200	205
Lys Arg Ala Arg Asp Val Ala Ser Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn			
	210	215	220
Ala His Asp Glu Gly Thr Tyr Ile Asn Asn Leu Lys Thr Glu Leu Thr			
225	230	235	240
Asn Asn Asn Asp Ala Leu Leu Arg Glu Asp Ser Arg Ser Asn Phe Tyr			
	245	250	255
Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asp Gly Gly Asn			
	260	265	270
Tyr Asp Pro Ser Lys Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp			
	275	280	285

Ser Gly Gln Asp Gln Arg Gly Ser Ser Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp  
290 295 300

Pro Glu Ala Phe Arg Pro Asp Gln Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser  
305 310 315 320

Lys Asp Arg Ser Ile Pro Arg Ser Pro Ala Lys Pro Gly Glu Gly Trp  
325 330 335

Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala  
340 345 350

Asp Lys Thr Thr Trp Thr His Gly Asp His Tyr His Ala Pro Asn Ser  
355 360 365

Asp Leu Gly Pro Met His Val His Glu Ser Lys Phe Arg Lys Trp Ser  
370 375 380

Ala Gly Tyr Ala Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile  
385 390 395 400

Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Ala Lys Val Glu Gln Gly Trp Pro  
405 410 415

<210> 3

<211> 1809

<212> DNA

<213> Streptoverticillium mobaraense

<220>

<221> CDS

<222> (578)..(1798)

<400> 3

gtcgacgcgg gccgggaggg ggtgcggcgg cgccttcgg ctgtgtggac gaagcgtcgg 60  
gtcggagggg cgcccgata tcgtccttgg ggcggggtgg ccggaattgc cgccatggtg 120  
ttgccgggga atcgaccga agacatgac acttctcgta tccaccgat cacgtatccg 180  
ggagtcgaga agtgttacgc cgtgcccctg tccgcgtcct caccctgtc gccgtgacag 240  
cgaccgcgt tcttcactc gcacggacgg cccacagga ctttcggcc cgggctcgcc 300  
ccgccgctc ggtgacggcc tccgaataac gcggccgccc gggcctcggc cggttgaccg 360  
atccgggtca cgcgccccgc cgggcgggcg gccacgtccg gtctcgcccc gcccgacatc 420  
ggctgcgact gccttcgctc gcatttctc ccgcctcccg gccgcgtttt tccgccgccc 480  
aaggtgcggc gacgcgtacc gaatccccct tcacgcgac gtgcttcgc acggccgcgt 540  
tcaacgatgt tccacgacaa aggagttgca ggtttcc atg cgc ata cgc cgg aga 595

Met Arg Ile Arg Arg Arg

1

5

gct ctc gtc ttc gcc act atg agt gcg gtg tta tgc acc gcc gga ttc 643  
Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val Leu Cys Thr Ala Gly Phe

10

15

20

atg ccg tcg gcc ggc gag gcc gcc gcc gac aat ggc gcg ggg gaa gag 691  
Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Ala Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu

25

30

35

acg aag tcc tac gcc gaa acc tac cgc ctc acg gcg gat gac gtc gcg 739  
Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala

40

45

50

aac atc aac gcg ctc aac gaa agc gct ccg gcc gct tcg agc gcc ggc 787  
Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly

55

60

65

70

ccg tcg ttc cgg gcc ccc gac tcc gac gac agg gtc acc cct ccc gcc 835  
Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala

75

80

85

gag ccg ctc gac agg atg ccc gac ccg tac cgt ccc tcg tac ggc agg 883  
Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg

90

95

100

gcc gag acg gtc gtc aac aac tac ata cgc aag tgg cag cag gtc tac 931  
Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr

105

110

115

agc cac cgc gac ggc agg aag cag cag atg acc gag gag cag cgg gag 979

Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu

120

125

130

tgg ctg tcc tac ggc tgc gtc ggt gtc acc tgg gtc aat tcg ggt cag 1027

Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln

135

140

145

150

tac ccg acg aac aga ctg gcc ttc gcg tcc ttc gac gag gac agg ttc 1075

Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe

155

160

165

aag aac gag ctg aag aac ggc agg ccc cgg tcc ggc gag acg cgg gcg 1123

Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala

170

175

180

gag ttc gag ggc cgc gtc gcg aag gag agc ttc gac gag gag aag ggc 1171

Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly

185

190

195

ttc cag cgg gcg cgt gag gtg gcg tcc gtc atg aac agg gcc ctg gag 1219

Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu

200

205

210

aac gcc cac gac gag agc gct tac ctc gac aac ctc aag aag gaa ctg 1267

Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu

215

220

225

230

gcg aac ggc aac gac gcc ctg cgc aac gag gac gcc cgt tcc ccg ttc 1315

Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe

235	240	245	
tac tcg gcg ctg cgg aac acg ccg tcc ttc aag gag cgg aac gga ggc			1363
Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly			
250	255	260	
aat cac gac ccg tcc agg atg aag gcc gtc atc tac tcg aag cac ttc			1411
Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe			
265	270	275	
tgg agc ggc cag gac cgg tcg agt tcg gcc gac aag agg aag tac ggc			1459
Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly			
280	285	290	
gac ccg gac gcc ttc cgc ccc gcc ccg ggc acc ggc ctg gtc gac atg			1507
Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met			
295	300	305	310
tcg agg gac agg aac att ccg cgc agc ccc acc agc ccc ggt gag gga			1555
Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly			
315	320	325	
ttc gtc aat ttc gac tac ggc tgg ttc ggc gcc cag acg gaa gcg gac			1603
Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp			
330	335	340	
gcc gac aag acc gtc tgg acc cac gga aat cac tat cac gcg ccc aat			1651
Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn			
345	350	355	



ggc agc ctg ggt gcc atg cat gtc tac gag agc aag ttc cgc aac tgg 1699  
Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp  
360 365 370

tcc gag ggt tac tcg gac ttc gac cgc gga gcc tat gtg atc acc ttc 1747  
Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe  
375 380 385 390

atc ccc aag agc tgg aac acc gcc ccc gac aag gta aag cag ggc tgg 1795  
Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp  
395 400 405

ccg tgatgtgagc g 1809  
Pro

<210> 4

<211> 407

<212> PRT

<213> Streptoverticillium mobaraense

<400> 4

Met Arg Ile Arg Arg Arg Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val  
1 5 10 15

Leu Cys Thr Ala Gly Phe Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Ala Asp  
20 25 30

Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu  
35 40 45

Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro  
50 55 60

Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp  
65 70 75 80

Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr  
85 90 95

Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg  
100 105 110

Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met  
115 120 125

Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr  
130 135 140

Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser  
145 150 155 160

Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg  
165 170 175

Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser  
180 185 190

Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val  
195 200 205

Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp  
210 215 220

Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu  
225 230 235 240

Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe  
245 250 255

Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val  
260 265 270

Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser Ala  
275 280 285

Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly  
290 295 300

Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro  
305 310 315 320

Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly  
325 330 335

Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn

340

345

350

His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu

355

360

365

Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly

370

375

380

Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp

385

390

395

400

Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro

405

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for  
amplification of transglutaminase gene from  
S.cinnamomeum

&lt;400&gt; 5

tccgatgacc gggaaactcc tccgcgcgag

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for  
amplification of transglutaminase gene from  
S.cinnamomeum

<400> 6

cggccagcct tgctccacct tggcgggggc

30

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Streptoverticillium cinnamomeum

<400> 7

Gly Asp Gly Glu Glu Lys Gly Ser Tyr Ala

1

5

10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07135

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N1/21, 9/10, 15/54 // (C12N1/21, C12R1:465)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N1/21, 9/10, 15/54

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, 481504, A1 (AMANO PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 22 April, 1992 (22.04.92) & JP, 5-199883, A & US, 5420025, A & DE, 69116495, E	1-7
A	WASHIZU, Kinya et al., "Molecular Cloning of the Gene for Microbial Transglutaminase from Streptovercillium and Its Expression in Streptomyces lividans", Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, January 23, 1994, Volume 58, Number 1, pages 82-87	1-7
A	WO, 96/06931, A1 (NOVO NORDISK A/S), 07 March, 1996 (07.03.96), especially, see pages 76-77, SEQ ID NO:2 & AU, 9532538, A & EP, 777726, A1 & NZ, 291414, A & JP, 10-504721, A & US, 6100053, A	1-7
A	DURAN, R. et al., "Purification, characterisation, and gene cloning of transglutaminase from Streptovercillium cinnamoneum CBS 683.68",	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
12 January, 2001 (12.01.01)Date of mailing of the international search report  
23 January, 2001 (23.01.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07135

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Biochimie, April, 1998, Volume 80, Number 4, pages 313-319	
A	PASTERNAK, Ralf et al., "Bacterial pro-transglutaminase from Streptovercillium mobaraense Purification, characterisation and sequence of the zymogen", European Journal of Biochemistry, November 1, 1998, Volume 257, Number 3, pages 570-576	1-7
A	EP, 889133, A2 (AJINOMOTO CO., INC.), 07 January, 1999 (07.01.99) & JP, 11-75876, A & CA, 2237041, A & US, 6013498, A & BR, 9802403, A & CN, 1253177, A	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C12N1/21, 9/10, 15/54 // (C12N1/21, C12R1:465)		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C12N1/21, 9/10, 15/54		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP, 481504, A1 (AMANO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 22.4月.1992 (22.04.92) & JP, 5-199883, A & US, 5420025, A & DE, 69116495, E	1-7
A	WASHIZU, Kinya et al., "Molecular Cloning of the Gene for Microbial Transglutaminase from <i>Streptovorticillium</i> and Its Expression in <i>Streptomyces lividans</i> ", Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, January 23, 1994, Volume 58, Number 1, pages 82-87	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	12.01.01	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 内 田 俊 生 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448
		4B 8214



C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 96/06931, A1 (NOVO NORDISK A/S) 7.3月.1996 (07.03.96) 特に、76-77ページの SEQ ID NO:2 参照 & AU, 9532538, A & EP, 777726, A1 & NZ, 291414, A & JP, 10-504721, A & US, 6100053, A	1-7
A	DURAN, R. et al., "Purification, characterisation, and gene cloning of transglutaminase from <i>Streptoverticillium</i> <i>cinnamomeum</i> CBS 683.68", Biochimie, April, 1998, Volume 80, Number 4, pages 313-319	1-7
A	PASTERNAK, Ralf et al., "Bacterial pro-transglutaminase from <i>Streptoverticillium mobaraense</i> Purification, char- acterisation and sequence of the zymogen", European Journal of Biochemistry, November 1, 1998, Volume 257, Number 3, pages 570-576	1-7
A	EP, 889133, A2 (AJINOMOTO CO., INC.) 7.1月.1999 (07.01.99) & JP, 11-75876, A & CA, 2237041, A & US, 6013498, A & BR, 9802403, A & CN, 1253177, A	1-7